

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09				
A 0 1 H 5/00	Z N A A	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 有 請求項の数6 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平6-41772

(22) 出願日 平成6年(1994)2月17日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年10月4日～  
10月6日、日本育種学会主催の「日本育種学会第84回講  
演会」において文書をもって発表

(71) 出願人 591040719

農林水産省 野菜・茶業試験場長  
三重県安芸郡安濃町大字草生360番地

(72) 発明者 平井 正志

三重県安芸郡安濃町大字田端上野910-49

(72) 発明者 佐藤 隆徳

三重県安芸郡安濃町大字大塚241番地

(72) 発明者 今井 剛

三重県安芸郡安濃町大字大塚241番地

(72) 発明者 伊藤 秀和

三重県安芸郡安濃町大字大塚241番地

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物の糖組成を改変する方法

(57) 【要約】

【構成】 配列表の配列番号1記載の塩基配列を有する  
トマト酸性インベルターゼ遺伝子を有する発現ベク  
ター、該発現ベクターを導入した形質転換植物並びに内在  
性のショ糖を分解する酵素のmRNAに対して相補的  
な、あるいは同一な塩基配列を有するmRNAの鋳型と  
なる遺伝子を植物に導入して該遺伝子を植物体中で転写  
させることにより、前記酵素のmRNAの翻訳を阻害  
し、植物体中における前記酵素量を低減させることを特  
徴とする糖組成の改変された植物の製造法。

【効果】 本発明により、トマト酸性インベルターゼ遺  
伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖を有する発現ベ  
クター、該発現ベクターを導入した形質転換植物並びに  
糖組成の改変された植物の製造法が提供される。したが  
って、本発明によれば、トマト、ジャガイモ等の植物体  
中における当該酵素の活性を抑制することができるよう  
になり、糖組成を制御した新規植物の効率的な育成等に  
大きく寄与することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1記載の塩基配列を有するトマト酸性インベルターゼ遺伝子を有する発現ベクター。

【請求項2】 請求項1記載の発現ベクターを導入した形質転換植物。

【請求項3】 形質転換植物がトマトまたはジャガイモである請求項2記載の形質転換植物。

【請求項4】 内在性のショ糖を分解する酵素のmRNAに対して相補的な、あるいは同一な塩基配列を有するmRNAの鋳型となる遺伝子を植物に導入して該遺伝子を植物体中で転写させることにより、前記酵素のmRNAの翻訳を阻害し、植物体中における前記酵素量を低減させることを特徴とする糖組成の改変された植物の製造法。

【請求項5】 植物がトマトまたはジャガイモである請求項4記載の植物の製造法。

【請求項6】 内在性のショ糖を分解する酵素が酸性インベルターゼである請求項4記載の植物の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、トマト酸性インベルターゼ遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖を有する発現ベクター、該発現ベクターを導入した形質転換植物並びに糖組成の改変された植物の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】酸性インベルターゼ（EC3.2.1.26、 $\beta$ -フルクトシダーゼとも称する。）は、酸性側のpHでショ糖をブドウ糖と果糖に加水分解する酵素である。栽培種トマト果実中の糖類は、ブドウ糖と果糖が大部分であるが、この特異的な糖蓄積は、果実の成熟時に当該酵素の活性が飛躍的に増大することが主要因であるとみなされている。

【0003】また、当該酵素活性は、低温貯蔵下のジャガイモ塊茎中においても認められており、低温貯蔵中の塊茎における還元糖の蓄積にも寄与していることが示唆されている（Journal of Experimental Botany, 41:95-99, 1990）。ジャガイモ塊茎は、収穫時には殆ど還元糖を含んでいないが、低温貯蔵中に還元糖の蓄積が起こり、これが加工時の品質低下を招くことから、低温貯蔵下で還元糖含量の低い品種の開発が望まれていた。

【0004】通常の交雑法で育成された栽培種トマトは、いずれもショ糖の蓄積量が少なく、これを通常の育種技術によって増大させるには、ショ糖を多く蓄積する野生種との交配を基にする必要がある。しかし、ショ糖を蓄積する形質が劣勢遺伝子支配（Plant Physiology, 95:1026-1035, 1991）であることを考慮すると、通常育種は非常に困難であり、多大な時間を要するものと考えられている。

【0005】また、ジャガイモ塊茎が低温貯蔵下で還元

糖を蓄積する現象は、Low temperature sweetening として広く知られている。塊茎の加工適性向上のため、各国で低還元糖化を目指した育種が盛んに行われている。しかし、適当な育種素材が少ない上に、栽培種のジャガイモが4倍体のものが主であることから、通常育種による品種開発は極めて困難である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、還元糖蓄積の主要因と考えられる酵素、酸性インベルターゼ活性を遺伝子操作によって抑制することによって、トマト等の植物体中の還元糖の蓄積量を減少させ、ショ糖の蓄積量を増大させる方法を確立し、本発明に到達した。すなわち、トマト（Lycopersicon 属、例えば L. esculentum cv. House Odoriko）果実由来の酸性インベルターゼ遺伝子を含むキメラ遺伝子をトマト植物に導入することにより、トマト果実中の糖組成を改変することに成功し、本発明を完成したのである。この技術を利用することにより、植物中の糖組成を改変し、多様化する消費者の嗜好に対応した新しい風味をトマト等の植物に付与することや、加工特性の優れたジャガイモ等を作出することが可能である。しかも、遺伝子工学的手法を用いるため、通常の育種よりも遙に短時間で目的とする植物品種を育成することができる。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、配列表の配列番号1記載の塩基配列を有するトマト酸性インベルターゼ遺伝子を有する発現ベクター、当該発現ベクターを導入した形質転換植物並びに内在性のショ糖を分解する酵素のmRNAに対して相補的な、あるいは同一な塩基配列を有するmRNAの鋳型となる遺伝子を植物に導入して該遺伝子を植物体中で転写させることにより、前記酵素のmRNAの翻訳を阻害し、植物体中における前記酵素量を低減させることを特徴とする糖組成の改変された植物の製造法に関する。

【0008】本発明の発現ベクターは、適当なベクターに5'から3'の向きで順番に転写プロモーター

（a）、センスあるいはアンチセンス鎖の向きの酸性インベルターゼ遺伝子（b）および転写ターミネーター

（c）を連結することにより作製される。このベクターを作製する手法は、文献（Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 等）に記載の各種手法に従えばよい。ここで用いるベクターとしては、植物を宿主とする場合、植物核ゲノム中に前記（a）～（c）の領域を安定に移行させることができるものであればいかなるものであってもよい。このようなベクターの例としては、通常クロニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクター

（pUC、pBR系プラスミドなど）やコインテグレートベクター、バイナリーベクター（pGA482、pGA580、pBI101、pBI121）等のTiプラ

スミド由来のベクター類、さらにはタバコモザイクウイルス (TMV) 等の植物ウイルス由来のベクターも使用可能である。

【0009】転写プロモーター (a) は、植物体内に必要なコードを表現せしめることができるものでなければならない。このようなプロモーターは、植物の特定の組織内および/または特定の発育段階において、表現を導くことが可能なDNAであって、植物に由来するものである必要はない。具体例としては、花キャベツのモザイクウイルスプロモーター35S、ノパリンシンターゼまたはオクトピンシンターゼプロモーター、パタチンプロモーター、ルビスコの小サブユニット遺伝子のプロモーター等がある。トマト、特にその果実内で発現させるプロモーター (a) は構成プロモーターおよび特異組織プロモーターのいずれでもよい。

【0010】転写ターミネーター (c) は、転写プロモーター (a) により転写された遺伝子 (b) の転写を終結できるものであれば、どのような種類のものであってもよい。

【0011】酸性インペルターゼ遺伝子 (b) は、形質転換しようとする植物種より単離されたものが望ましい。当該遺伝子 (b) としては、核遺伝子あるいは相補的遺伝子 (cDNA) を使用する。トマト果実での酸性インペルターゼ活性の抑制を行う場合には、赤色果実由来の酸性インペルターゼ cDNA あるいはトマト酸性インペルターゼ核遺伝子を使用する。この遺伝子 (b) をベクターに連結する際の方向は、センス鎖あるいはアンチセンス鎖を発現する方向のいずれでもよい。前者の場合には、センス鎖導入による活性抑制が期待でき (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 1770-1774, 1991)、後者の場合には、アンチセンス鎖発現による活性抑制が期待できる。

【0012】発現ベクターを植物細胞に導入する場合、植物としてトマトあるいはジャガイモを使用するが、この場合、アグロバクテリウム法、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法 (爆撃法) などが使用可能である。後者の3法は、基となるベクターの種類は問わないが、アグロバクテリウム法の場合には、Tiプラスミド由来のベクター類を基に作製した発現ベクターを使用する必要がある。これを一旦アグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404等に導入し、本組換え微生物を植物細胞に共存培養することなどにより感染させることによって、宿主植物細胞を形質転換することができる。なお、植物においてはこれらの形質転換細胞より形質転換体を再生させるには、既知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

【0013】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

## 実施例

酸性インペルターゼ mRNA のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖を植物中で発現させるベクター (pBTI-1 はセンス鎖発現用、pBTI-2 はアンチセンス鎖発現用) の一例を図1に示した。pBluescript KS<sup>+</sup> にクローン化された配列表の配列番号1に記載のトマト果実酸性インペルターゼ cDNA (Japanese Journal of Genetics, 67: 491-492, 1992) を制限酵素 SmaI, SacI により切り出し、SmaI, SacI消化によりβ-グルクロニダーゼ遺伝子を除去したパイナリーベクターpBI121 (EMBO Journal, 6: 3901-3907, 1987) に連結し、発現ベクターを作製した。

【0014】この方法は、ベクター上の制限酵素認識部位を利用しているので、あらかじめcDNAをpBluescript KS<sup>+</sup> にセンス鎖、アンチセンス鎖の向きにクローン化しておくことにより、2種の発現ベクターの作製が容易となる。作製したセンス鎖、アンチセンス鎖を発現する2種のベクターは、三代配偶法 (トリペアレンタルメーティング法) によりアグロバクテリウム・ツメファシエンズ (Agrobacterium tumefaciens) の菌株LBA4404に移行させた。このアグロバクテリウム株をトマト植物の形質転換に使用した。発現ベクター中にはpBI121に由来するカナマイシン抵抗性遺伝子 (ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ, NPT-II) もコードされており、これも形質転換時に植物核DNAに移行するので、形質転換体の選抜にはカナマイシンが使用できる。

【0015】トマト植物の形質転換法は以下の通りである。すなわち、トマト (Lycopersicon esculentum cv. House Odoriko) 種子を無菌的に発芽させ、1~2週間後に得られた子葉を分割し、MSZ培地 (Murashige-Skoog (MS), Zeatin 1mg/l) 上に表皮が下になるように置床し、25℃、16時間日長のもとで一晩培養する。この子葉を上記アグロバクテリウムの一晩培養液 (YEB培地にKanamycin 50mg/l, Rifampicin 5mg/l, Streptomycin 250mg/lを添加したものに菌を加え一晩培養した液) をYEB培地でOD<sub>680</sub>=0.1に希釈した菌懸濁液中に5分間浸した後、ろ紙上で吸水させる。

【0016】YEB培地

Beaf extract (Bacto)	5g/l
Yeast extract	1g/l
Bacto peptone	5g/l
Sucrose	5g/l

pH 7.2に調整後、1リットルにつき1mlの2M MgCl<sub>2</sub>を添加する。

【0017】次いで、前培養した培地にろ紙を敷き、その上に子葉を表皮を下になるように置床し、前培養と同条件で二日おく。その後、MSZにカルベニシリン500mg/lを添加した培地 (MSZ-C) にこれらの子葉を前記と同様に移植し、前培養と同条件下で一週間培養する。この段階から付着したアグロバクテリウム菌のカル

ペニシリンによる除去を開始する。その後、子葉をZMSにカルペニシリン500mg/l, Kanamycin 50mg/lを添加した培地 (MSZ-CK) に移植し、形質転換された細胞を選抜する。

【0018】 枝条の切り出しが可能になるまで2～3週間ごとにMSZ-CKに子葉の移植を繰り返す。切り出した枝条はMSにカルペニシリン250mg/lを添加した培地上で培養、維持し、展開した葉を用いて遺伝子が導入されたかどうかをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により確認した。なお、PCR法に用いたプライマーの配列は、クローニングの際にcDNAの両端に連結したアダプターDNA (Amersham, cDNA cloning system λgt

10) の配列に由来する。配列は、配列表の配列番号2に示すとおりである。遺伝子の導入が確認された個体は、鉢上げして温室で栽培を行った。

【0019】 形質転換体及び非形質転換体の果実、葉における酸性インペルターゼの抽出は、大山らの方法に準じて行った (野菜茶業試験場報告、印刷中?)。果実や葉の糖類は、80%エタノールで抽出後、HPLC (Shodex KS-801カラム、日本分光) による分析を行った。活性測定の結果を第1表に、糖分析の結果を第2、3表に示す。

【0020】

【表1】

第1表 成熟果実中における酸性インペルターゼ活性

植 物	形質転換に 用いた遺伝子	インペルターゼ活性(nmol/min/g 新鮮重) 可溶性画分	細胞壁画分
S-BG-1	β-グルクロニダーゼ	6160.0	29.5
AS-IV-4	アンチセンスAiv-1	87.4	n. e. *
AS-IV-6	アンチセンスAiv-1	43.6	6.2
AS-IV-7	アンチセンスAiv-1	20	3.7
AS-IV-8	アンチセンスAiv-1	16.9	n. e.
AS-IV-9	アンチセンスAiv-1	4.8	n. e.

\* : 測定せず

【0021】

【表2】

第2表 成熟果実中における各種糖含量

植 物	形質転換に 用いた遺伝子	糖含量(mg/g 新鮮重)		
		ショ糖	ブドウ糖	果 糖
S-BG-1	β-グルクロニダーゼ	1.4	20.2	21.5
AS-IV-4	アンチセンスAiv-1	6.5	19.3	19.0
AS-IV-6	アンチセンスAiv-1	14.9	7.8	8.6
AS-IV-7	アンチセンスAiv-1	4.9	20.1	19.9
AS-IV-8	アンチセンスAiv-1	4.4	14.0	14.6
AS-IV-9	アンチセンスAiv-1	5.2	16.2	16.4

【0022】

【表3】

第3表 葉における各種糖含量

植 物	形質転換に 用いた遺伝子	糖含量(mg/g 新鮮重)		
		ショ糖	ブドウ糖	果 糖
S-BG-1	β-グルクロニダーゼ	1.49	3.71	9.50
AS-IV-6	アンチセンスAiv-1	2.33	1.40	5.31
AS-IV-7	アンチセンスAiv-1	3.62	2.59	7.51
AS-IV-8	アンチセンスAiv-1	2.68	2.72	8.59

【0023】 果実中の酸性インペルターゼ活性は、不溶性画分、可溶性画分ともにアンチセンス鎖を発現するベクター (pBTI-2) により殆ど抑制されていた (第1表)。それに伴い、果実中の還元糖含量は減少し、ショ糖含量の著しい増大が認められた (第2表)。CaMV 35Sプロモーターは、構成的プロモーターと考えられており、葉においても活性の抑制、還元糖含量の減少、ショ糖含量の増大が認められたが、センス鎖を発現するベクター (pBTI-1) を導入した個体にも著しいショ糖含量の増大が認められ、センス鎖の導入もアンチセンス鎖発現同様、糖組成の改変に効果的であることが確認された (第3表)。

【0024】 さらに、今回得られた個体は、いずれも正

常な生育を示しており、本発現ベクターの導入により植物中の糖組成のみを特異的に改変することが十分可能であることが示された。

【0025】

【発明の効果】 本発明により、トマト酸性インペルターゼ遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖を有する発現ベクター、該発現ベクターを導入した形質転換植物並びに糖組成の改変された植物の製造法が提供される。したがって、本発明によれば、トマト、ジャガイモ等の植物体中における当該酵素の活性を抑制することができるようになり、糖組成を制御した新規植物の効率的な育成等に大きく寄与することができる。

【0026】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2339

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源

生物名: トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

株名: 品種 'ハウスおどりこ'

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 1..1662

特徴を決定した方法: E

特徴を表す記号: mat peptide

存在位置: 277..1659

特徴を決定した方法: E

【0027】

配列

ATG GCC ACT CAG TGT TAT GAC CCC GAA AAC TCC GCC TCT CGT TAC ACA	48
Met Ala Thr Gln Cys Tyr Asp Pro Glu Asn Ser Ala Ser Arg Tyr Thr	
-90 -85 -80	
TTA CTC CCG GAT CAA CCC GAT TCC GGC CAC CGG AAG TCC CTT AAA ATC	96
Leu Leu Pro Asp Gln Pro Asp Ser Gly His Arg Lys Ser Leu Lys Ile	
-75 -70 -65	
ATC TCC GGC ATT TTC CTC TCC GTT TTC CTT TTG CTT TCT GTA GCC TTC	144
Ile Ser Gly Ile Phe Leu Ser Val Phe Leu Leu Leu Ser Val Ala Phe	
-60 -55 -50	
TTT CCG ATC CTC AAC AAC CAG TCA CCG GAC TTG CAA ATC GAC TCC CGT	192
Phe Pro Ile Leu Asn Asn Gln Ser Pro Asp Leu Gln Ile Asp Ser Arg	
-45 -40 -35 -30	
TCG CCG GCG CCG CCG TCA AGA GGT GTT TCT CAG GGA GTC TCC GAT AAA	240
Ser Pro Ala Pro Pro Ser Arg Gly Val Ser Gln Gly Val Ser Asp Lys	
-25 -20 -15	
ACT TTT CGA GAT GTA GCC GGT GCT AGT CAC GTT TCT TAT GCG TGG TCC	288
Thr Phe Arg Asp Val Ala Gly Ala Ser His Val Ser Tyr Ala Trp Ser	
-10 -5 1	
AAT GCT ATG CTT AGC TGG CAA AGA ACG GCT TAC CAT TTT CAA CCT CAA	336
Asn Ala Met Leu Ser Trp Gln Arg Thr Ala Tyr His Phe Gln Pro Gln	
5 10 15 20	
AAA AAT TGG ATG AAC GAT CCT AAT GGA CCA TTG TAT CAC AAG GGA TGG	384
Lys Asn Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Pro Leu Tyr His Lys Gly Trp	
25 30 35	
TAC CAC CTT TTT TAT CAA TAC AAT CCA GAT TCA GCT ATT TGG GGA AAT	432
Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Asp Ser Ala Ile Trp Gly Asn	
40 45 50	
ATC ACA TGG GGC CAT GCT GTA TCC AAG GAC TTG ATC CAC TGG CTC TAC	480
Ile Thr Trp Gly His Ala Val Ser Lys Asp Leu Ile His Trp Leu Tyr	
55 60 65	
TTG CCT TTT GCC ATG GTT CCT GAT CAA TGG TAT GAT ATT AAC GGT GTC	528
Leu Pro Phe Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Asn Gly Val	
70 75 80	
TGG ACA GGG TCC GCT ACC ATC CTA CCC GAT GGT CAG ATC ATG ATG CTT	576
Trp Thr Gly Ser Ala Thr Ile Leu Pro Asp Gly Gln Ile Met Met Leu	
85 90 95 100	
TAT ACC GGT GAC ACT GAT GAT TAT GTG CAA GTG CAA AAT CTT GCG TAC	624
Tyr Thr Gly Asp Thr Asp Asp Tyr Val Gln Val Gln Asn Leu Ala Tyr	
105 110 115	
CCC GCC AAC TTA TCT GAT CCT CTC CTT CTA GAC TGG GTC AAG TTC AAA	672

Pro Ala Asn Leu Ser Asp Pro Leu Leu Leu Asp Trp Val Lys Phe Lys	
120 125 130	
GGC AAC CCG GTT CTG GTT CCT CCA CCC GGC ATT GGT GTC AAG GAC TTT	720
Gly Asn Pro Val Leu Val Pro Pro Pro Gly Ile Gly Val Lys Asp Phe	
135 140 145	
AGA GAC CCG ACT ACT GCT TGG ACC GGA CCA CAA AAT GGG CAA TGG CTG	768
Arg Asp Pro Thr Thr Ala Trp Thr Gly Pro Gln Asn Gly Gln Trp Leu	
150 155 160	
TTA ACA ATC GGG TCT AAG ATT GGT AAA ACG GGT GTT GCA CTT GTT TAT	816
Leu Thr Ile Gly Ser Lys Ile Gly Lys Thr Gly Val Ala Leu Val Tyr	
165 170 175 180	
GAA ACT TCC AAC TTC ACA AGC TTT AAG CTA TTG GAT GGA GTG CTG CAT	864
Glu Thr Ser Asn Phe Thr Ser Phe Lys Leu Leu Asp Gly Val Leu His	
185 190 195	
GCG GTT CCG GGT ACG GGT ATG TGG GAG TGT GTG GAC TTT TAC CCG GTA	912
Ala Val Pro Gly Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Phe Tyr Pro Val	
200 205 210	
TCT ACT AAA AAA ACA AAC GGG TTG GAC ACA TCA TAT AAC GGG CCG GGT	960
Ser Thr Lys Lys Thr Asn Gly Leu Asp Thr Ser Tyr Asn Gly Pro Gly	
215 220 225	
GTA AAG CAT GTG TTA AAA GCA AGT TTA GAT GAC AAT AAG CAA GAT CAT	1008
Val Lys His Val Leu Lys Ala Ser Leu Asp Asp Asn Lys Gln Asp His	
230 235 240	
TAT GCT ATT GGT ACG TAT GAC TTG GGA AAG AAC AAA TGG ACA CCC GAT	1056
Tyr Ala Ile Gly Thr Tyr Asp Leu Gly Lys Asn Lys Trp Thr Pro Asp	
245 250 255 260	
AAC CCG GAA TTG GAT TGT GGA ATT GGG TTG AGA CTA GAC TAT GGG AAA	1104
Asn Pro Glu Leu Asp Cys Gly Ile Gly Leu Arg Leu Asp Tyr Gly Lys	
265 270 275	
TAT TAT GCA TCA AAG ACT TTT TAT GAC CCG AAG AAA GAA CGA AGA GTA	1152
Tyr Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp Pro Lys Lys Glu Arg Arg Val	
280 285 290	
CTG TGG GGA TGG ATT GGG GAA ACT GAC AGT GAA TCT GCT GAC CTG CAG	1200
Leu Trp Gly Trp Ile Gly Glu Thr Asp Ser Glu Ser Ala Asp Leu Gln	
295 300 305	
AAG GGA TGG GCA TCT GTA CAG AGT ATT CCA AGG ACA GTG CTT TAC GAC	1248
Lys Gly Trp Ala Ser Val Gln Ser Ile Pro Arg Thr Val Leu Tyr Asp	
310 315 320	
AAG AAG ACA GGG ACA CAT CTA CTT CAG TGG CCA GTG GAA GAA ATT GAA	1296
Lys Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln Trp Pro Val Glu Glu Ile Glu	
325 330 335 340	
AGC TTA AGA GTG GGT GAT CCT ACT GTT AAG CAA GTC GAT CTT CAA CCA	1344
Ser Leu Arg Val Gly Asp Pro Thr Val Lys Gln Val Asp Leu Gln Pro	
345 350 355	
GGC TCA ATT GAG CTA CTC CGT GTT GAC TCA GCT GCA GAG TTG GAT ATA	1392
Gly Ser Ile Glu Leu Leu Arg Val Asp Ser Ala Ala Glu Leu Asp Ile	
360 365 370	
GAA GCC TCA TTT GAA GTG GAC AAA GTC GCG CTT CAG GGA ATA ATT GAA	1440
Glu Ala Ser Phe Glu Val Asp Lys Val Ala Leu Gln Gly Ile Ile Glu	
375 380 385	

GCA GAT CAT GTA GGT TTC AGT TGC TCT ACT AGT GGA GGT GCT GCT AGC 1488  
Ala Asp His Val Gly Phe Ser Cys Ser Thr Ser Gly Gly Ala Ala Ser  
390 395 400  
AGA GGC ATT TTG GGA CCA TTT GGT GTC ATA GTA ATT GCT GAT CAA ACG 1536  
Arg Gly Ile Leu Gly Pro Phe Gly Val Ile Val Ile Ala Asp Gln Thr  
405 410 415 420  
CTA TCT GAG CTA ACG CCA GTT TAC TTT TAC ATT TCT AAA GGA GCT GAT 1584  
Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ser Lys Gly Ala Asp  
425 430 435  
GGT CGT GCA GAG ACT CAC TTC TGT GCT GAT CAA ACT AGG TTT GCT TTT 1632  
Gly Arg Ala Glu Thr His Phe Cys Ala Asp Gln Thr Arg Phe Ala Phe  
440 445 450  
CTA TCT GGC ACA ATT AAT TTG TCC TTG TAAAATGGAG ATGGATAAAA 1679  
Leu Ser Gly Thr Ile Asn Leu Ser Leu  
455 460  
GTAGCGGGTT GTTGATCTGA TATATGCAGA TCCTCTGAGG CTCGGGGAGT TGCTAAACAA 1739  
GTTTATGGTA GTTCAGTACC TGTGTTGGAC GGTGAAAAAC ATTCAATGAG ATTATTGGTG 1799  
GATCACTCAA TTGTGGAGAG CTTTGCTCAA GGAGGAAGAA CAGTCATAAC ATCGCGAATT 1859  
TACCCAACAA AGGCAGTAAA TGGAGCAGCA CGACTCTTTG TTTTCAACAA TGCCACAGGG 1919  
GCTAGCGTTA CTGCCTCCGT CAAGATTTGG TCACTTGAGT CAGCTAATAT TCAATCCTTC 1979  
CCTTTGCAAG ACTTGTAATC TTCCTTATTT CGTTTTTTTT TTCTTTTTC TTTGAAGGTT 2039  
ATTTCAACCGA CGTCCCATCA AGAAAGGGAA GAGGGAGATC AATATATGTA GTGTTATTCG 2099  
CCCTACCTTA GGATTAGATG TCATCTAGCA ATGTCAAATC TAGTAGAGTA TACAATGTAT 2159  
GGGTTCTCGG AAACCGAGTA GAGCTTACCT GGATTCTATG TAAACTAAGA AAGCTCAGCA 2219  
AATATATGCA CAAATAATTT ACAGAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2279  
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2339

【0028】配列番号：2

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0029】配列

AATTCGAGGATCCGGGTACCTTGG 24

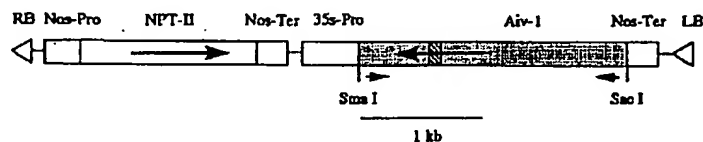
【図面の簡単な説明】

【図1】 トマト形質転換に使用した発現ベクターである。

【符号の説明】

矢印は遺伝子(AIV-1)がコードされている方向を示す。  
PBはバイナリーベクター上のT-DNA 由来右側境界配列を、LBは左側境界配列を示す。NOS はノバリンシンターゼの略である。NPT-IIはネオマイシンホスホトランスアセチラーゼ ジーン(カナマイシン抵抗性遺伝子)の略である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 西村 繁夫

茨城県つくば市並木3-7-1-645-1

(72)発明者 大山 暁男

静岡県磐田市東新町1-5-9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**